



资助证书

青岛大学 赵霞 (全国博管会编号:235535) 获得中国博士后科学基金
第68批面上资助二等。资助编号: 2020M682128。

特颁此证。

The certificate certifies its holder is awarded the fellowship of China Postdoctoral
Science Foundation .

中国博士后科学基金会
2020 年 11 月 03 日



青岛大学附属医院

青年科研基金合同书

学 科 分 类: 淋巴瘤

项 目 名 称: NLRP3 炎症小体在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的
表达及相关功能研究

项 目 类 别: ☒优秀项目 ☐普通项目

立 项 时 间: 2019 年 01 月 01 日

结 题 时 间: 2020 年 12 月 31 日

项目负责人: 赵霞 手机 [REDACTED]

科 室: 淋巴瘤科

青岛大学附属医院

二〇一八年制

一、项目概况

研究目标：明确 NLRP3 炎症小体在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的多态性和表达，明确主要效应因子，指导临床，评估其对疾病发生发展及预后评估的意义。

研究内容：研究弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 NLRP3 炎症小体相关基因的多态性和表达，并评估其临床意义，利用弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞系进行功能试验进一步探索其功能并阐明其在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的作用机制。

拟解决的关键科学问题：

- 1、NLRP3 炎症小体相关基因 SNPs 与弥漫大 B 细胞淋巴瘤的易感性及预后的相关性。
- 2、NLRP3 炎症小体相关基因在弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者中的表达情况。
- 3、通过功能实验验证 NLRP3 炎症小体促进弥漫大 B 细胞淋巴瘤发生发展的效应分子。

研究方案：

1、弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 NLRP3 相关基因 SNPs 检测：选取 300 例左右弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者和 200 例左右健康对照者为研究对象，刮取淋巴瘤患者骨髓涂片，抽取健康对照者 EDTA 抗凝全血，然后应用 DNA 样本提取试剂盒提取 DNA，PCR（探针法）检测 IL-18（rs1946518）、IL-1 β （rs16944）、CARD8（rs2043211）、NF κ B 94 ins/del（rs28362491）各基因分型。

2、弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者及正常对照的 NLRP3 相关基因的表达：选取 50-70 例弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者和 50 例健康对照提取外周血 mRNA，反转录成 cDNA，设计引物，应用 RT-PCR 方法检测淋巴瘤患者和正常对照者的外周血单个核细胞中 IL-18、IL-1 β 、caspase-1、NLRP3、ASC、NF κ B 基因 mRNA 水平的表达。应用 ELISA 方法检测弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者和健康对照外周血清中 IL-18、IL-1 β 的水平。免疫组织化学方法检测弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者淋巴瘤组织病理切片及正常淋巴结组织切片中 NLRP3 相关基因 IL-18、NLRP3、ASC 的表达。

3、在弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞系中加入 LPS+ATP 处理后，应用 Western blot 法检测 ASC 及 NF κ B 蛋白的表达水平，以 GAPDH 作内参。

4、设置地塞米松浓度梯度，观察 NLRP3 炎症小体活化对弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞系药物敏感性影响。实验分组设计为对照组、LPS+ATP 组、DEX 组、DEX+LPS+ATP 组，收集各组细胞和上清液进行相关指标检测。应用 ELISA 方法测定各组细胞培养上清液中 IL-18 和 IL-1 β 的浓度，应用 RT-PCR 方法检测各组细胞 IL-18、IL-1 β 、caspase-1、NLRP3、c-myc、TP53、bcl-2、bax 基因 mRNA 水平的表达。

5、在弥漫大 B 细胞淋巴瘤培养体系中加入 IL-18 和抗 IL-18 培养 48h。实验分组设计为对照组、DEX 组、IL-18+DEX 组、抗 IL-18+DEX 组，收集各组细胞进行相关指标检测。应用 RT-PCR 方法检测各组细胞 c-myc、TP53、bcl-2、bax 基因 mRNA 水平的表达。

6、CCK8 方法检测各组细胞增殖情况，并进行药敏分析；根据细胞周期试剂盒说明应用流式细胞术进行细胞周期分析；使用 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒流式细胞术分析各组细胞凋亡情况。

7、统计学分析：将连续变量和分类变量用方差分析或非参数 Kruskal-Wallis 检验进行比较。标准卡方检验用于测试 Hardy-Weinberg 平衡的基因型频率。通过计算优势比 (OR) 和相应的 95% 置信区间 (CI) 来评估基因型与疾病风险之间的关联。使用 Mann-Whitney U 检验进行 RT-PCR 和 ELISA 检测的各组结果之间的比较。Kaplan-Meier 曲线用于描述存活。进行细胞实验三次，定量数据表示为平均值 $\pm$ 标准差，使用非配对 t 检验进行统计学分析。P < 0.05 被认为具有统计学意义。

可行性分析：

1. 我院血液科是省级重点学科，临床及科研力量基础雄厚，完全具备完成本研究的实力与能力；

2. 我院拥有质量一流的实验室,拥有质量优良的流式细胞仪、酶联免疫分析仪、PCR 分析仪等,技术人员经验丰富,且标记抗体的选择参考了国内外最新的文献,均为国外知名公司的产品,能够保证标本处理的均一性和正确性。

3. 课题申请人为博士,副主任医师,且曾到山东大学齐鲁医院血液病实验室专门进修学习科研技术,具有较强的科研能力。且本课题我们已经进行了前期的研究及预实验,相关结果已发表 SCI 论文 1

篇。

特色与创新之处:

1、研究 NLRP3 炎症小体相关基因 SNPs 与弥漫大 B 细胞淋巴瘤的易感性及预后的相关性,发现基因多态性影响弥漫大 B 细胞淋巴瘤易感性及生存期的相关因素。

2、从基因、分子生物学等水平对弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者 NLRP3 炎症小体相关基因表达情况进行分析,且对比治疗前后的指标变化,并将淋巴瘤患者外周血相关基因表达情况与 SNP 结果结合在一起进行分析。

3、首次通过功能实验证实 NLRP3 炎症小体通过其下游基因因子的作用,寻找可能影响弥漫大 B 细胞淋巴瘤发生发展的效应因子。

二、项目验收内容和考核指标

主要技术指标（优秀项目和普通项目）：预期目标必须说明项目期内研究所要达到的指标，如形成的论文著作发表情况、知识产权情况、获奖情况、获得其他课题资助支持进一步研究的可能等。

以第一作者或最后一位通讯作者发表 SCI 论文 1-2 篇，累计影响因子大于 8，积极以我院为第一单位申请国家级及省级课题，争取至少获得课题 1 项。

三、年度计划

(年度计划分研究内容和预期目标两部分阐述。研究内容要具体说明当年需完成的研究任务以便于项目中期检查；预期目标要说明当年所能解决的问题、课题研究的进展程度和指标、文章、专利等情况，对预期目标要有较为具体的叙述。)

年度	研究内容	预期目标
第一年	1. 着手搜集病人的信息，收集标本及处理，完善获得临床数据 2. 购买细胞株，设计并进行功能试验	通过实验验证 NLRP3 炎症小体促进弥漫大 B 细胞淋巴瘤发生发展的效应分子。
第二年	1、统计数据、结果分析、得出结论 2. 文章发表 3. 申请相关课题	1. 获得足够的研究数据 2. 用 SPSSSPSS18.0 软件进行数据统计分析 3. 争取发表 1-2 篇论著，目标是 SCI 论文 4. 申报国家级或省级课题

四、项目资金预算表

(金额单位: 万元)

序号	科目名称	金额	备注 (计算依据与说明)
1	材料费	1.9	
2	测试化验加工费	1.2	
3	燃料动力费	0.4	
4	会议费	0.6	
5	出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.6	
6	劳务费	0.3	
合计		5.0	

五、合同书各方签章

1、项目负责人承诺：

我将履行项目负责人职责，严格遵守青年基金评审委员会的有关规定，切实保证研究工作时间，认真开展工作，按时报送有关材料。若填报失实和违反规定，本人将承担全部责任。如未按时结题未完成预期指标，自愿接受记录科研诚信档案、通报批评并按规定收回经费扣罚绩效等处罚措施。

签字： 

2、合同书双方约定共同遵守《青岛大学附属医院青年科研基金管理办法》（以下简称《办法》）。本合同书签订各方均负有相应的责任，若有争议或纠纷时，按《办法》有关条款处理。

甲方：青岛大学附属医院



乙方：项目负责人（签字）



2019 年 04 月 10 日